

University of Groningen

## Topology of a type I secretion system for bacteriocins of *Lactococcus lactis*

Franke, Christian Marc

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

1998

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Franke, C. M. (1998). *Topology of a type I secretion system for bacteriocins of Lactococcus lactis*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. s.n.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

## **CHAPTER VIII**

**Samenvatting voor de leek**

**Zusammenfassung für den Laien**

**Résumé pour le profane**

## Samenvatting voor de leek

Tijdens dit promotieonderzoek is gekeken naar het secretie mechanisme en systeem van lactococcines, hetgeen bacteriocines zijn afkomstig van de melkzuurbacterie *Lactococcus lactis*. Zo, dat is een hele mond vol, maar waar hebben we het nu eigenlijk over ?

Laten we beginnen met het begrip melkzuurbacterie. Alhoewel bacteriën vaak worden geassocieerd met ziekten en viezigheid, zijn er toch heel veel bacteriën die juist erg belangrijk en nuttig zijn. Een zeer bekende groep van deze “goede” bacteriën zijn de melkzuurbacteriën. Deze bacteriën spelen een cruciale rol in de zuivelindustrie, maar ook in andere gefermenteerde voedsel (en voeder) producten. Zij zorgen voor biologische conservering van producten waarin zij voorkomen door de vorming van melkzuur en andere stoffen die de groei van andere (voedsel bedervende) micro-organismen remmen, maar zij zijn ook van groot belang voor de smaak- en aromavorming van het product. Daarnaast kunnen melkzuurbacteriën ook nog andere belangrijke eigenschappen hebben, die van belang zijn voor de uiteindelijke kwaliteit en eigenschappen van producten, maar het gaat iets te ver hierop nu in te gaan.

Hoe moet men zich de melkzuurbacterie *Lactococcus lactis* nu voorstellen? Klein, vooral klein. Bacteriën zijn namelijk niet met het blote oog te zien. Ze bestaan slechts uit één enkele cel. Kijken we door een microscoop naar *Lactococcus lactis* zien we eigenlijk slechts bolletjes die soms alleen zijn, maar die meestal met elkaar verbonden zijn in korte of langere ketens (als een soort parelsnoer). *Lactococcus lactis* kan simplistisch worden voorgesteld als een voetbal. Van binnen naar buiten bestaat deze bacterie uit het cytoplasma (de binnenkant van de bal) waar allerlei stoffen worden geproduceerd, een cytoplasma membraan (de “binnenbal”) en een celwand (de leren buitenbal). Een interessante eigenschap van *Lactococcus lactis* is dat sommige van deze bacteriën eiwitten produceren die worden uitgescheiden en dan andere bacteriën (die vaak niet wenselijk zijn) kunnen doden. Deze eiwitten zijn de bacteriocinen. Er bestaat een grote belangstelling voor deze bacteriocinen gezien de mogelijke medische relevantie en mogelijke toepassingen in de voedselconservering. Het interessante is namelijk dat deze bacteriocines eiwitten zijn. Deze eiwitten worden in het spijsverteringskanaal op natuurlijke wijze afgebroken zonder nadelige gevolgen voor de consument. Hierdoor bestaat de mogelijkheid om chemische producten (conserveringsmiddelen, antibiotica) te vervangen door biologische. Eiwitten zijn namelijk lichaamseigen stoffen die een zeer belangrijke rol vervullen in ons leven. Eiwitten zijn weer opgebouwd uit elementaire bouwstenen, de aminozuren. Door nu verschillende aminozuren “aan elkaar te plakken” ontstaan dus de verschillende eiwitten. In elke cel ligt de informatie opgeslagen hoe de verschillende bouwstenen moeten worden gecombineerd om de gewenste eiwitten te maken. De cel beschikt dus over een soort bouwplan, het DNA. DNA wordt ook vaak omschreven als de erfelijke informatie of genetische code. Deze informatie wordt steeds van moedercel naar dochtercel doorgegeven. De moleculaire genetica houdt zich bezig op dit DNA niveau. Door

namelijk het DNA te veranderen door stukken DNA te verwijderen, te vervangen of nieuw te introduceren kan de “bouwplan” zodanig veranderd worden dat er nieuwe of andere eiwitten door de cellen worden gemaakt.

In het in dit proefschrift beschreven onderzoek is gekeken hoe een bepaald bacteriocine (lactococcine A; LcnA), dat wordt geproduceerd in het cytoplasma van bepaalde *Lactococcus lactis* cellen, naar buiten komt. In het cytoplasma wordt LcnA gemaakt, dat iets groter is dan het LcnA dat buiten de cel wordt aangetroffen. We spreken daarom over preLcnA in het cytoplasma en over (matuur) LcnA aan de buitenkant van de cel. Om de buitenkant van de cel te bereiken heeft LcnA de hulp nodig van twee andere eiwitten, namelijk LcnC en LcnD. Deze twee eiwitten vormen samen een soort kanaal waardoor LcnA kan worden uitgescheiden (denk maar aan het ventiel van de bal, waardoor de lucht uit de bal kan ontwijken). In het tweede hoofdstuk van dit proefschrift is gekeken hoe LcnD met de cytoplasma membraan geassocieerd is. Hiervoor zijn stukken DNA die gedeeltes van LcnD coderen (het *lcnD* gen) “geplakt” aan DNA dat een bepaald reporter eiwit codeert en is dit DNA in bacteriële cellen gebracht (getransformeerd). Op deze manier worden door cellen die dit nieuwe DNA hebben opgenomen, eiwitten gemaakt die gedeeltelijk bestaan uit een stuk LcnD en een ander stuk, het reporter eiwit. Deze nieuwe eiwitten, fusie-eiwitten genaamd, kunnen dan al of niet een bepaalde activiteit hebben die gemeten kan worden of die zichtbaar wordt doordat de kolonies van deze cellen een bepaalde kleur hebben als ze op speciale voedingsbodems worden gegroeid. Deze activiteit is afhankelijk van de plaats waar het reporter gedeelte van het eiwit terecht komt (in de cel of aan de buitenkant). De twee gebruikte reporter eiwitten in deze studie waren  $\beta$ -galactosidase (LacZ) en alkalische fosfatase (PhoA). LacZ is alleen maar actief in de cel (het cytoplasma), terwijl PhoA slechts actief is aan de buitenkant van de cytoplasma membraan in *Escherichia coli* (zie Fig. 2, Hoofdstuk I). Deze bacterie wordt vaak gebruikt omdat deze relatief gemakkelijk is te manipuleren voor wat betreft het isoleren en (her)introduceren van DNA.

Uit deze studies is gebleken dat een klein stukje LcnD (van ongeveer 20 aminozuren) zich in het cytoplasma bevindt, een ongeveer even lang stuk door de cytoplasma membraan steekt en het grootste gedeelte (ongeveer 430 aminozuren) zich aan de buitenkant van de cytoplasma membraan bevindt (zie Hoofdstuk II).

Om op een makkelijkere manier dit soort fusie-eiwitten te maken is een systeem ontwikkeld waarmee het DNA (gen) van een eiwit waarin men is geïnteresseerd op zowel gerichte als willekeurige plaatsen met het gen van het reporter eiwit kan worden gefuseerd. Dit staat beschreven in Hoofdstuk III.

Dit systeem is vervolgens gebruikt in Hoofdstuk IV om LcnC te onderzoeken. De resultaten van de aldus gemaakte fusie-eiwitten duiden er op dat zowel “begin” (de N-terminus) en “einde” (de C-terminus) van LcnC in het cytoplasma zit en dat hiertussen een deel ligt dat vier keer door de membraan steekt (zie Fig. 1B en C, Hoofdstuk IV). Bovendien

kon worden aangetoond dat het N-terminale deel van LcnC verantwoordelijk is voor de afsplitsing van een aantal aminozuren (= processing) van de N-terminus van preLcnA tijdens het transport van LcnA naar de buitenkant van de cel, waardoor het (mature) LcnA ontstaat.

In Hoofdstuk V is vervolgens gekeken naar LcnA zelf. Hiervoor zijn enkele aminozuren van LcnA veranderd of nieuwe aminozuren geïntroduceerd in LcnA. Vervolgens is gekeken naar de antibacteriële activiteit van deze veranderde (gemuteerde) LcnA afgeleiden en is met behulp van biochemische methoden gekeken waar deze “LcnA mutanten” terecht komen. Uit dit onderzoek is gebleken dat alle mutaties de antibacteriële activiteit van het bacteriocine drastisch verlaagden of zelfs geheel teniet deden. Bovendien is aangetoond dat preLcnA, evenals alle mutanten, in de cytoplasma membraan te vinden zijn, ongeacht de aanwezigheid van LcnC en LcnD. In het geval van het ongemuteerde LcnA werd dit eiwit geheel in de cytoplasma membraan aangetroffen, terwijl in het geval van de mutanten, de verdeling van deze eiwitten over de verschillende delen van de cel werd beïnvloed door de mutaties en, in de meeste gevallen, ook door de aanwezigheid van het transportsysteem. Het eerste suggereert dat preLcnA van zich uit de eigenschap bezit een binding aan te gaan met de cytoplasma membraan. Bovendien is aangetoond dat het C-terminale gedeelte van preLcnA van belang is voor deze binding en, althans in de aanwezigheid van het transport systeem, ook de N-terminus, die het secretiesignaal bevat.

In Hoofdstuk VI is vervolgens een fusie-eiwit gemaakt van de eerste (N-terminale) 80 aminozuren van LcnD met de eerste ca. 100 aminozuren van een virus eiwit. Met behulp van biochemische technieken kon worden aangetoond dat dit stuk viraal eiwit aan de buitenkant van *Lactococcus lactis* kan worden gepresenteerd.

## Zusammenfassung für den Laien

In dieser Doktor Arbeit ist Forschung verrichtet worden nach dem Sekretions Mechanismus und System für “Lactococcine”, die Bakteriozine sind, die aus der Milchsäurebakterie *Lactococcus lactis* stammen. Wahrscheinlich haben dies nur die wenigsten verstanden, also wovon reden wir überhaupt?

Lasst uns anfangen bei dem Begriff Milchsäurebakterie. Obwohl Bakterien oft verbunden werden mit Krankheiten und Unsauberkeit, gibt es doch eine ganze Menge Bakterien, die gerade sehr wichtig und nützlich sind. Eine sehr bekannte Gruppe dieser “guten” Bakterien sind die Milchsäurebakterien. Diese Bakterien spielen eine äußerst wichtige Rolle in der Fabrikation von vielen Milchprodukten wie Käse und Yoghurt. Außerdem sind diese Bakterien auch sehr wichtig in anderen fermentierten Lebens- und Futtermitteln. Sie sorgen für die biologische Konservierung der Produkte in denen sie vorkommen, da sie Milchsäure und andere Stoffe formen, die das Wachstum anderer (ungebetenen) Mikroorganismen verhindern. Außer dieser Eigenschaft tragen sie zudem bei zu der Geschmacks- und Aromaformung der Produkte. Auch andere Eigenschaften der Milchsäurebakterien können eine wichtige Rolle spielen in der letztendlichen Qualität der Produkte aber es führt zu weit jetzt hierauf ein zu gehen.

Wie sollte man sich die Milchsäurebakterie *Lactococcus lactis* vorstellen? Klein, sehr klein! Bakterien kann man nämlich nicht mit dem bloßen Auge sehen. Sie bestehen nur aus einer einzigen Zelle. Beschauen wir *Lactococcus lactis* durch ein Mikroskop, sehen wir eigentlich nur kleine Kügelchen, die manchmal einzeln vorkommen aber meist miteinander verbunden sind in kurzen oder längeren Ketten (wie eine Art Perlenkette). Sehr vereinfacht könnte man sich eine *Lactococcus lactis* Bakterie als einen Fußball vorstellen. Von innen nach außen besteht eine Bakterie aus dem Zytoplasma (das Innere des Balls), in dem allerlei Stoffe produziert werden, der Zytoplasmatischen Membran (der Plastikschauch im Ball) und der Zellwand (die Lederaußenhülle).

Wie bereits eher erwähnt, produzieren Milchsäurebakterien neben der Milchsäure auch andere Stoffe mit antibakterieller Wirkung. Beispiele solcher Stoffe sind die Bakteriozine. Dies sind Proteine, die durch Bakterien ausgeschieden werden und dann das Wachstum anderer Bakterien verhindern. Sowohl in der Industrie als auch in der Wissenschaft besteht ein großes Interesse an diesen Bakteriozinen, vor allem weil sie nicht schädlich sind für Mensch und Tier und eine große Rolle spielen könnten in der biologischen (nicht chemischen) Konservierung oder der Bekämpfung von Infektionen. Proteine sind nämlich ein wichtiger Bestandteil unserer täglichen Nahrung und sind für uns nicht schädlich, weil sie in unserem Speisepfeife abgebrochen werden ohne jegliche Probleme für den Konsumenten.

Gehen wir nun etwas tiefer in die Materie. Was ist genau ein Protein? Ein Protein, auch Eiweiß genannt, besteht aus elementaren Bausteinen, den Aminosäuren. Unterschiedliche Proteine unterscheiden sich durch eine verschiedene Zusammensetzung und Anzahl dieser Aminosäuren. Die Information, wie diese Bausteine zusammengefügt werden, um ein Protein zu formen kann in jeder Zelle gefunden werden in der Form der Erbinformation: dem DNA. DNA kann man also sehen als eine Art Sammlung von Bauplänen (dem genetischen Code) verschiedener Proteine. Die Molekulargenetik beschäftigt sich mit diesem DNA. Indem man das DNA verändert durch hier Teile heraus zu schneiden, zu ersetzen oder neu einzubauen kann man nämlich den Bauplan eines Proteins ändern oder einen neuen Bauplan erstellen. Auf diese Art und Weise kann man also die Zelle neue oder veränderte Proteine produzieren lassen.

In dieser These ist Forschung verrichtet worden nach einem bestimmten Bacteriozin, dem Lactococcin A (LcnA). Dieses LcnA wird in dem Zytoplasma mancher *Lactococcus lactis* Zellen produziert wonach es einen Weg aus der Zelle heraus findet. Letzteres nennt man die "Sekretion". LcnA wird in dem Zytoplasma in einer etwas größeren Form produziert als man es außerhalb der Zelle als aktives Bacteriozin antrifft. Darum spricht man von preLcnA in der Zelle und nennt man die Form außerhalb der Zelle LcnA. Um nun die Außenseite der Zelle zu erreichen bedarf LcnA der Hilfe zweier anderer Proteine: LcnC und LcnD. Diese beiden Proteine formen zusammen eine Art von Kanal durch den LcnA das Innere der Zelle verlassen kann (man kann sich dies in etwa vorstellen wie das Ventil des Balles wodurch die Luft entweichen kann).

In dem zweiten Kapitel dieser These ist untersucht worden wie LcnD in der Zytoplasmatischen Membran gelegen ist. Zu diesem Zweck sind verschiedene Stücke DNA, die Teile von LcnD codieren (dem Gen für LcnD) verbunden worden mit DNA daß bestimmte "Reporter Proteine" codiert und nach dieser Behandlung ist das DNA wieder in die bakteriellen Zellen gebracht worden (diesen Vorgang nennt man "Transformation"). Auf diese Art und Weise werden von den Zellen, die dieses neue DNA aufgenommen haben, neue Proteine gemacht die teils aus Stücken von LcnD und zum anderen Teil aus den Reporter Proteinen bestehen. Diese neuen Proteine, "Fusions Proteine" genannt, können dann in bestimmten Fällen eine bestimmte Aktivität haben, die man messen kann oder die man sichtbar machen kann durch die Zellen, die solche Fusions Proteine machen auf bestimmten Nährboden wachsen zu lassen, wobei sich ein Farbstoff bildet, wenn es diese Aktivität gibt. Ob ein bestimmtes Fusion Protein nun eine Aktivität besitzt hängt von zwei Faktoren ab: dem Reporter Protein und der Position des Reporter Protein Teils bezüglich der Zytoplasmatischen Membran ("drinnen" oder "draußen"). Die zwei Reporter Proteine, die gebraucht worden

sind, sind  $\beta$ -Galactosidase (LacZ) und Alkalische Phosphatase (PhoA). LacZ hat nur Aktivität in der Zelle (dem Zytoplasma), während PhoA nur aktiv ist an der Außenseite der Zytoplasmatischen Membran in der Bakterie *Escherichia coli* (illustriert in Kapitel I, Figur 2). Diese bestimmte Bakterie wird sehr oft gebraucht in genetischen Studien, da es relativ einfach ist, das DNA aus dieser Bakterie zu isolieren und wieder einzubringen. Die Studie dieser Fusions Proteine hat erwiesen, dass ein kleines Stück LcnD (bestehend aus etwa 20 Aminosäuren) sich in dem Zytoplasma befindet, ein etwa gleich großes Stück LcnD durch die Zytoplasmatische Membran läuft und so der größte Teil (von etwa 430 Aminosäuren) sich an der Außenseite dieser Membran befindet.

Um die Konstruktion von Fusions Proteinen mit LacZ und PhoA zu vereinfachen ist ein System entwickelt worden, das in Kapitel III beschrieben steht. Mit diesem System kann man ganz bestimmte Teile eines Proteins fusieren mit LacZ oder PhoA (gezielte Fusionen), jedoch besteht auch die Möglichkeit, Fusionen, zu machen die nicht gezielt sind (“random” Fusionen).

In Kapitel IV steht beschrieben wie dieses System gebraucht worden ist, um LcnC zu untersuchen. Die gefundenen Resultate weisen darauf hin, dass sowohl der “Anfang” (der sogenannte “N-Terminus”) als auch das “Ende” (der “C-Terminus”) von LcnC sich in dem Zytoplasma befinden und das LcnC vier Regionen hat, die in der Zytoplasmatischen Membran zu finden sind, wodurch LcnC fest in dieser Membran verankert ist (Figur 1B und C, Kapitel IV). Außerdem konnte bewiesen werden, dass der N-Terminus verantwortlich ist für die Umsetzung des preLcnA in die (kleinere) LcnA Form, indem dieser N-Terminus die ersten 20 Aminosäuren von preLcnA entfernt.

In Kapitel V ist nach möglichen Signalen in (pre)LcnA gesucht worden, die der Zelle zeigen, dass LcnA ausgeschieden werden soll und die wichtig sind für die Lokalisierung des preLcnA Proteins. Hierfür sind einige Aminosäuren in preLcnA verändert oder eingefügt worden. Anschließend wurden die antibakteriellen Eigenschaften dieser neuen LcnA “Mutanten” bestimmt worden und ist mit der Hilfe biochemischer Techniken untersucht worden, wo sich diese Mutanten in oder außerhalb der Zelle befinden. Diese Studie zeigte, dass alle Mutationen in (pre)LcnA zu einer stark verminderten oder sogar völlig abwesender antibakteriellen Wirkung des Bakteriozins führten. Außerdem zeigte sich, dass preLcnA, ebenso wie alle Mutanten, schon in der Zytoplasmatischen Membran zu finden ist, ungeachtet der Anwesenheit des Transportsystems, bestehend aus LcnC und LcnD. Im Falle von preLcnA (ohne Mutationen) wurde dieses Protein ausschließlich in der Zytoplasmatischen Membran angetroffen, zumal im Falle der Mutanten die Verteilung dieser Proteine in der Zelle durch die verschiedenen Mutationen und, in den meisten Fällen, auch durch die Anwesenheit des Transportsystems beeinflusst wurde. Dies weist darauf hin, dass preLcnA, von sich aus, die



Eigenschaft hat eine Bindung mit der Membran an zu gehen. Außerdem konnte bewiesen werden, dass diese Bindung mit der Zytoplasmatischen Membran verursacht wird durch den C-Terminus des preLcnA, und, zumindest in der Anwesenheit des Transportsystems, durch den N-Terminus, der das Sekretionssignal befasst.

In Kapitel VI steht beschrieben, wie die ersten 80 Aminosäuren von LcnD gekoppelt worden sind an die ersten etwa 100 Aminosäuren von einem Virus Proteins. Mit der Hilfe von biochemischen Techniken konnte gezeigt werden, dass der Teil des Virus Proteins in dem Fusions Protein an der Außenseite von *Lactococcus lactis* Zellen präsentiert werden kann.

## Résumé pour le profane

Ce travail de thèse décrit le système de sécrétion des lactococcines qui sont des bactériocines produites par une des bactéries lactiques du lait, *Lactococcus lactis*. Vous n'avez probablement pas compris cela, alors voici un peu plus d'explications.

Commençons par le terme de bactérie lactique du lait. Bien que la plupart des bactéries soient souvent le signe de manque de propreté ou responsable de maladie, certaines sont au contraire très importantes et utiles. Un groupe très connu de ces “bonnes” bactéries est celui des bactéries lactiques du lait. Ces bactéries jouent un rôle majeur dans la fabrication de beaucoup de produits laitiers comme les fromages ou les yaourts. De plus, elles ont aussi un rôle très important dans d'autres produits d'alimentation fermentés pour l'homme (saucisses, choucroute, et bien d'autres) ou pour l'animal (ensilage). Elles assurent la conservation des produits dans lesquelles elles sont présentes, en produisant de l'acide lactique ainsi que d'autres substances qui ont le pouvoir d'inhiber le développement d'autres microorganismes (indésirables). Elles participent également à la formation du goût et de la texture de ces produits. Elles ont aussi d'autres propriétés qui contribuent à la qualité des produits finis, mais ce serait trop long à développer ici.

Comment peut-on imaginer la bactérie lactique *Lactococcus lactis*? Petite, très petite! En effet, les bactéries ne peuvent pas être vues à l'oeil nu, elles sont constituées seulement d'une seule cellule. Si nous regardons *Lactococcus lactis* au microscope nous voyons des petites billes, qui se trouvent seules ou dans des petites chaînes plus ou moins longues (comme un collier de perles). Plus simplement, vous pouvez imaginer *Lactococcus lactis* comme un ballon de foot. De l'intérieur vers l'extérieur, la bactérie est composée du cytoplasme (l'intérieur du ballon) dans lequel certaines substances sont produites, la membrane cytoplasmique (la vessie du ballon) et la paroi cellulaire (l'extérieur en cuir).

Comme dit précédemment, les bactéries lactiques produisent outre l'acide lactique d'autres substances antibactériennes. Les bactériocines sont des exemples de telles substances. Les bactériocines sont des protéines qui sont sécrétées par des bactéries et qui inhibent le développement d'autres bactéries. Elles font l'objet de beaucoup d'intérêt aussi bien dans l'industrie que dans la recherche, car elles ne sont dangereuses ni pour l'homme ni pour l'animal et elles peuvent jouer un rôle important dans la conservation biologique (non chimique) des produits ou combattre des infections. Comme les protéines constituent une part importante de notre alimentation journalière, elles ne sont pas dangereuses pour nous, car elles sont dégradées dans notre intestin et sont donc sans problème pour le consommateur.

Allons un peu plus profondément dans le sujet. Qu'est-ce qu'une protéine? Une protéine est composée d'unités élémentaires, les acides aminés. Les protéines diffèrent par le nombre et la composition de leurs acides aminés. L'information qui explique comment les unités élémentaires (les acides aminés) doivent s'assembler pour former une protéine se trouve dans

chaque cellule au niveau de l'information génétique, l'ADN. L'ADN peut donc être comparé à une collection de plans de construction (le code génétique) pour différentes protéines. La génétique moléculaire agit au niveau de l'ADN. La modification, en retirant, en changeant ou bien encore en additionnant des parties de l'ADN, permet de changer ou de créer les plans de construction des protéines. De cette façon on peut faire produire par la cellule des protéines modifiées ou complètement nouvelles.

Dans cette thèse, une certaine bactériocine, Lactococcine A (LcnA) a été étudiée. Cette LcnA est produite dans le cytoplasme de certaines cellules de *Lactococcus lactis*, après quoi elle quitte la cellule (c'est la "sécrétion"). LcnA est produite dans le cytoplasme sous une forme un peu plus grande que celle qui se trouve hors de la cellule et qui est la forme active de la bactériocine. C'est pourquoi, on parle de preLcnA dans la cellule et de LcnA à l'extérieur de la cellule. Pour aller à l'extérieur de la cellule, LcnA a besoin de l'aide de deux autres protéines : LcnC et LcnD. Ensemble ces deux protéines forment une sorte de chenal par lequel LcnA peut sortir de la cellule (on peut imaginer la valve d'un ballon de foot par laquelle l'air peut s'échapper). Dans le second chapitre de cette thèse, il est étudié comment LcnD est fixé dans la membrane cytoplasmique. Pour analyser cela, différentes parties d'ADN qui codent pour LcnD (le gène codant pour LcnD) ont été connectées à l'ADN de certaines "protéines de détection". Après ce traitement, l'ADN a été remis dans la cellule bactérienne (cette étape est appelée "transformation"). Les cellules qui ont pris ce nouvel ADN vont ainsi produire des protéines qui sont constituées à la fois de différentes parties de LcnD et de la protéine de détection. Ces nouvelles protéines appelées "protéines de fusion" peuvent avoir dans certains cas une certaine activité que l'on peut mesurer ou que l'on peut voir en faisant pousser les cellules qui produisent de telles protéines dans un milieu qui change de couleur quand l'activité est présente. L'activité d'une "protéine de fusion" dépend de deux facteurs: la protéine de détection et la position de celle-ci dans la "protéine de fusion" par rapport à la membrane cytoplasmique (dans ou hors de la cellule). Les deux "protéines de détection" qui ont été utilisées sont la  $\beta$ -galactosidase (LacZ) et la phosphatase alcaline (PhoA). LacZ est uniquement active dans la cellule (cytoplasme), tandis que PhoA est seulement active à l'extérieur de la membrane cytoplasmique de la bactérie *Escherichia coli* (comme le montre la figure 2 du chapitre I). Cette bactérie est souvent utilisée dans les études génétiques car il est relativement facile d'isoler son ADN et de le réintroduire de nouveau. Les études avec ces "protéines de fusion" ont montré qu'un petit morceau de LcnD (constitué approximativement de 20 acides aminés) se trouve dans le cytoplasme, une autre partie de taille équivalente traverse la membrane cytoplasmique et de cette façon la partie la plus grande (environ 430 acides aminés) se trouve placée à l'extérieur de la cellule bactérienne.

Afin de rendre plus facile les constructions avec les "protéines de fusion", LacZ et PhoA, un système a été développé et il est décrit dans le chapitre III. Avec ce système on peut joindre

des parties très spécifiques d'une protéine avec LacZ ou PhoA (fusions dirigées), mais il est aussi possible de faire des fusions qui ne sont pas dirigées (fusions au hasard).

Dans le chapitre IV, il est décrit comment ce système a été utilisé pour analyser LcnC. Les résultats montrent que le “début” (aussi appelé “N-terminus”) ainsi que la “fin” (le “C-terminus”) de LcnC sont dans le cytoplasme et que LcnC a quatre régions qui se trouvent dans la membrane cytoplasmique, par lesquelles LcnC est fermement attachée à cette membrane (Figure 1B et C du chapitre IV). De plus, il a été montré que le “N-terminus” est responsable de la transformation de la preLcnA en sa forme plus petite, LcnA, en enlevant les premiers 20 acides aminés de la preLcnA.

Dans le chapitre V, il est étudié quels signaux dans la (pre)LcnA, font que LcnA se retrouve à l'extérieur de la cellule bactérienne, et qui sont importants pour la localisation de la protéine preLcnA. Pour cela des acides aminés ont été changés ou ajoutés dans la preLcnA, et l'activité antibactérienne de ces nouvelles LcnA, “mutantes”, a été déterminée. En plus, la localisation de ces mutants dans la cellule, ou en dehors, a été étudiée avec l'aide de méthodes biochimiques. Cette étude a montré, que toutes les mutations dans (pre)LcnA font que son activité antibactérienne est très réduite ou même complètement absente. En plus, il a été montré que preLcnA ainsi que tous les mutants se trouvent dans la membrane cytoplasmique avec ou sans la présence du système de transport composé de LcnC et LcnD. Dans le cas de preLcnA (sans aucune mutation) cette protéine se trouve uniquement dans la membrane cytoplasmique. Ceci implique que la preLcnA a elle-même la propriété de s'accrocher à la membrane cytoplasmique. Tandis que pour les mutants leurs positions dans la bactérie sont différentes en fonction des changements effectués dans la preLcnA et, dans la plupart des cas, par la présence du système de transport. Il a aussi été montré que l'accrochage à la membrane cytoplasmique se fait par le “C-terminus” de la preLcnA et, également quand le système de transport est présent, par le “N-terminus” qui contient l'information de transport.

Dans le chapitre VI, il est décrit comment les 80 premiers acides aminés de LcnD ont été attachés aux 100 acides aminés d'une protéine d'un virus. Avec l'aide de techniques biochimiques il a été montré que la partie de la protéine du virus dans cette “protéine de fusion” pouvait être exposée à l'extérieur des cellules de *Lactococcus lactis*.